

[特集：第2回民間部門研究開発功績者の業績]

カイコによるネコインターフェロンの大量生産システムの開発

矢内 顯・植田 吉純・後藤 基治郎・米澤 康男

東レ株式会社

1. はじめに

イヌやネコは生活の重要な伴侶としての位置を占め、コンパニオンアニマルと呼ばれている。当社では、1993年からネコカリシウイルスによるネコ風邪を適用症としたネコインターフェロンを主剤とした動物用医薬品“インターキャット”を製造し、獣医師に供している。1997年にはイヌパルボウイルスによるイヌ下痢症にも適応症を拡大した。

“インターキャット”の製造にはカイコを利用している。すなわち、ネコインターフェロンのcDNAを組込んだ組換えカイコバキュロウイルスをカイコに感染させ、カイコ体内で組換えウイルスを増殖させることによってカイコ体液中にネコインターフェロンを蓄積させ、これを精製・製剤化する。

カイコを用いた生産法を選んだ理由は、ネコインターフェロンの生産性において、大腸菌などほかの一般的な遺伝子操作を用いた生産系よりもカイコが生産系が優れていたからである。

2. カイコを利用したネコインターフェロンの生産

1) 従来宿主での生産性

ネコの細胞からクローニングしたネコインターフェロン（以下FeIFNと略称する）をコードするcDNA（矢内, 1996）を用い、一般的な各

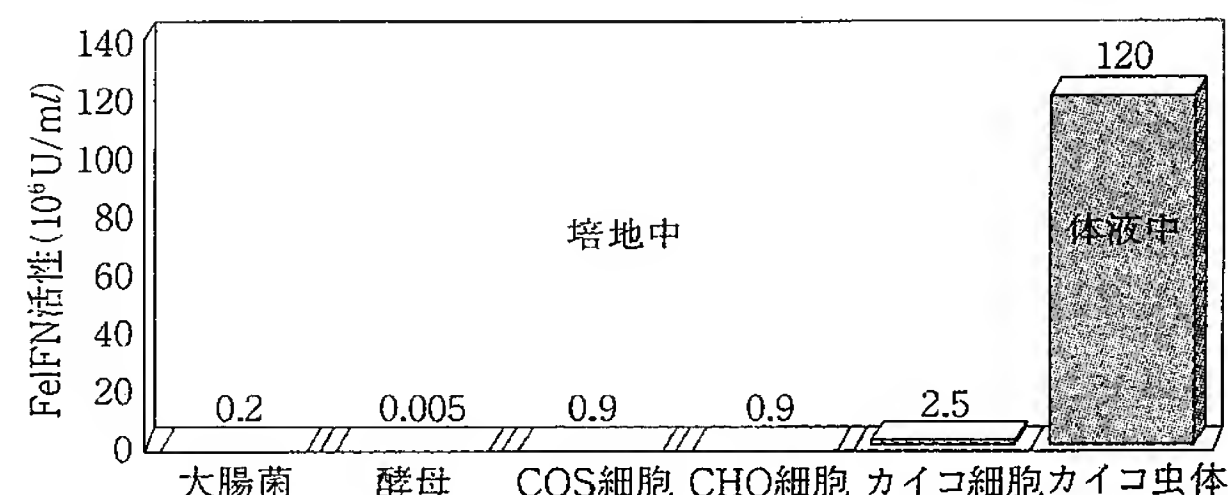


図1 各生産法での生産性の比較

種生産系で生産性向上を検討した。大腸菌、酵母、サルのCOS細胞、ハムスターのCHO細胞での生産性はそれぞれ、 $2 \times 10^5 \text{ U/ml}$ 、 $5 \times 10^3 \text{ U/ml}$ 、 $9 \times 10^5 \text{ U/ml}$ 、 $9 \times 10^5 \text{ U/ml}$ しか得られなかった（図1）。事業化のためにはコストダウンの技術的ブレイクスルーが課題となった。

2) カイコ利用法の特徴

昆虫のバキュロウイルスは、自らの保存安定性を確保するために、多量のポリヘドリンタンパク質を生産し、多角体を形成している。この生産量の高さが注目され、ポリヘドリン遺伝子のプロモーターを利用したタンパク質の生産系が、テキサスA&M大学のSummers博士らによって1983年発明された。キンウワバの一種のバキュロウイルスを利用して、昆虫培養細胞でヒトインターフェロン- β を生産させた（Smith, 1983）。次いでカリフォルニア大学の前田博士らによってカイコのバキュロウイルスとカイコ虫体を用いた系でヒトインターフェロン- α の生産が発明された（Maeda, 1985）。

組換えバキュロウイルスを用いると、一般的

Akira YANAI, Yoshizumi UEDA, Motojiro GOTO and Yasuo YONEZAWA: Development of mass production system for feline interferon using silkworm

にカイコの体液 1 ml あたり 1 mg 前後の目的タンパク質が生産される。これくらい濃度が高いと精製は難しくない。また、この方法には、組換えウイルスの作製やその純化といった遺伝子操作の容易さの利点もある。

3) FeIFN 生産への応用

クローニングベクター pBM030 (Horiuchi, 1997) を用い、FeIFN をコードする cDNA を含む DNA 断片を基にして、通常の手法で FeIFN をコードする cDNA を含む組換えウイルスを作製した。

単相培養したカイコ BM-N 細胞に本組換えウイルス液を添加し感染させ、27℃ で 3 日培養すると、培養液中に FeIFN が $2.5 \times 10^6 \text{ U/ml}$ 生産された。これは、大腸菌の場合の 10 倍以上の生産量だった。そこで、工業生産のため細胞の浮遊培養も検討したが、細胞の増殖がよくないうえ、細胞の血清依存性が高いことから不利と判断し、カイコ虫体の利用に切り替えた。5 齢カイコに組換えウイルス液を 1 頭あたり $50 \mu\text{l}$ ずつ注入し、4 日間、人工飼料を与えて飼育したところ、カイコ体液中に $6.5 \times 10^7 \text{ U/ml}$ の FeIFN が蓄積した。

4) FeIFN の単一成分化

カイコの表皮を切って塩酸中に入れて、組換えウイルス及びタンパク質分解酵素を失活させ、中和、遠心分離の後、遠心上清をブルーセファロース、次いで銅キレートセファロースの 2 段のクロマトグラフィーで FeIFN を精製した。電気泳動では単一バンドであったが、逆相 HPLC にかけたところ、2 種類の FeIFN 混合物であることがわかった。2 種類の成分の N 末端アミノ酸配列を調べたところ、多くの α 型インターフェロンに共通な Cys-Asp-Leu-Pro-… のものと、これにさらに 2 アミノ酸残基が付加した形である Leu-Gly-Cys-Asp-Leu-Pro-… のものであった (図 2)。2 種の生産物が生じるのは、

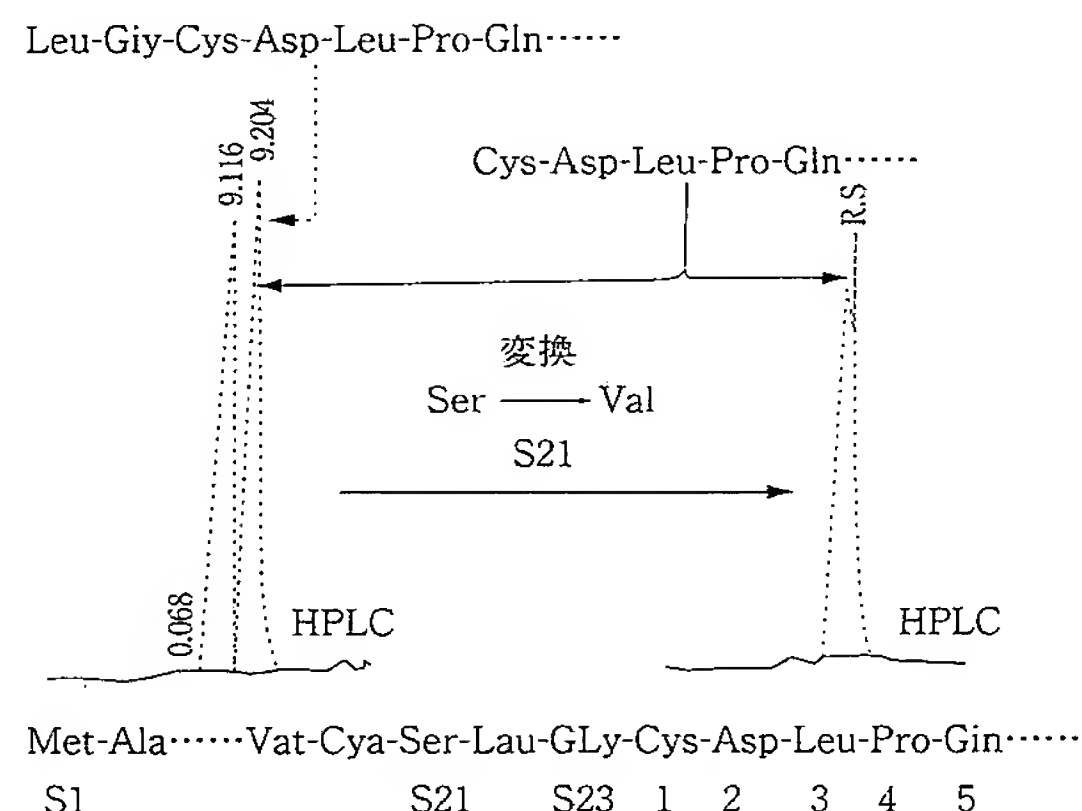


図 2 FeIFN の単一成分化

前駆体のタンパク質の切断が、Gly-Cys 間と Ser-Leu の間の 2 カ所で起こっているためと推定した。大腸菌の発現系に組入れたところ、Cys-Asp-Leu-Pro-… の N 末端アミノ酸配列を有するものに FeIFN 活性が認められた。そこで、Ser-Leu 間で切断が起こらないようにし、Cys-Asp-Leu-Pro-… だけが生産ができるようにするため、-3 位の Ser をほかのアミノ酸に替えた前駆体を作る組換えウイルスの作製を試みた。Ser コードを Val コードに替えた組換えウイルスは、期待とおり N 末端アミノ酸が Cys から始まる単一成分のみを生産した (Ueda, 1993)。単一成分化によって、体液中の FeIFN の生産量は $1.2 \times 10^8 \text{ U/ml}$ に向上した。以下、単一成分化した FeIFN を rFeIFN ω と称する。

5) rFeIFN ω の構造的特徴

rFeIFN ω の全アミノ酸配列を決めたところ、C 末端アミノ酸は cDNA の塩基配列から推定された 171 番目の Lys ではなく、170 番目の Glu であることがわかり C 末端でもプロセシングが行われていることが推定された (Ueda, 1993)。

カイコで生産した rFeIFN ω には 79 番目のアミノ酸である Asn に N 型糖鎖が付着していた。糖鎖の主要成分は 1 種で、その構造は Man-Man-GlcNac-GlcNac (Fuc)-Asn79 と推定される (Ueda, 1996)。

3. 実用化技術の開発

1) 実用化のための課題

組換え体を用いる製造プロセスの実用化のポイントは、安全性と組換え体の封じ込めである。カイコは数千年にわたり、人間の手で飼育されてきた結果、野外での生存能力が欠如した無害な生物である。一方、カイコバキュロウイルスは、動植物に対しては感染性や病原性も知られてなく、その組換えバキュロウイルスは多角体を持たないため、野外での存在は難しい。したがってカイコとカイコバキュロウイルスを用いる方法は、2-2) 項で述べた利点以外に、安全性と組換え体の封じ込めの観点からも優れた方法である。

しかし、この方法は実用化されることはなかった。その理由は、工業的な組換えウイルス封じ込め法の確立が困難であったことが1つの主要原因と考える。また、カイコに組換えウイルスを感染させたり、カイコ体液中から失活なく高収率でタンパク質を抽出するなど、大量のカイコを処理する技術が確立されなかったためと考える。

そこで、カイコとカイコバキュロウイルスを用いる方法を実用化するために、次の課題を設定した。①組換えウイルスの封じ込め方法の確立、②カイコ体液からのrFeIFN ω の抽出方法の確立、③組換えウイルスの接種方法の確立。

2) 組換えウイルスの封じ込め方法

体液中にrFeIFN ω と共存する組換えウイルスの封じ込めは、rFeIFN ω が酸性で安定である性質を利用した。すなわち、カイコの体液を塩酸酸性で処理し、組換えウイルスを失活させることに成功した(矢内, 1999)。この方法は組換えウイルスを不活化することができるばかりでなく、次の利点がある。①カイコ抽出液中に存在するタンパク質分解酵素を失活させ、抽出液中でのネコインターフェロン活性を安定化す

ることができる。②低pHにより高分子のタンパク質が変性し中和により不溶化することにより、次工程である精製工程の負担を軽減できる。③使用する薬剤が塩酸であるため、アルカリで中和するだけで使用薬剤の製品への残留の心配がない。

3) rFeIFN ω の抽出方法

塩酸酸性条件下で組換えウイルスを失活することができたことから、カイコからのrFeIFN ω の抽出は、カイコの表皮を切ってそれを塩酸中に入れることを基本として検討した。

カイコの腹部を開らなくても、尾脚の先を切るか、腹部に注射針を刺して、塩酸中につけるだけでカイコ体内圧(膨圧)によって、rFeIFN ω は効率よく抽出された。この小さい傷を付ける方法では、タンパク質分解酵素も含まれる中腸内容物の漏出を抑え、体液のみを塩酸中に出すことができるため、次の精製工程の負担を軽減できた。

カイコ切開機の開発については、表皮だけを傷つけることに主眼をおいて開発を行った。傷つけ方として、回転刃、超音波を発する刃物、高圧液体の噴射が有効であった。回転刃、超音波を発する刃物で実用機を作製した。何れとも

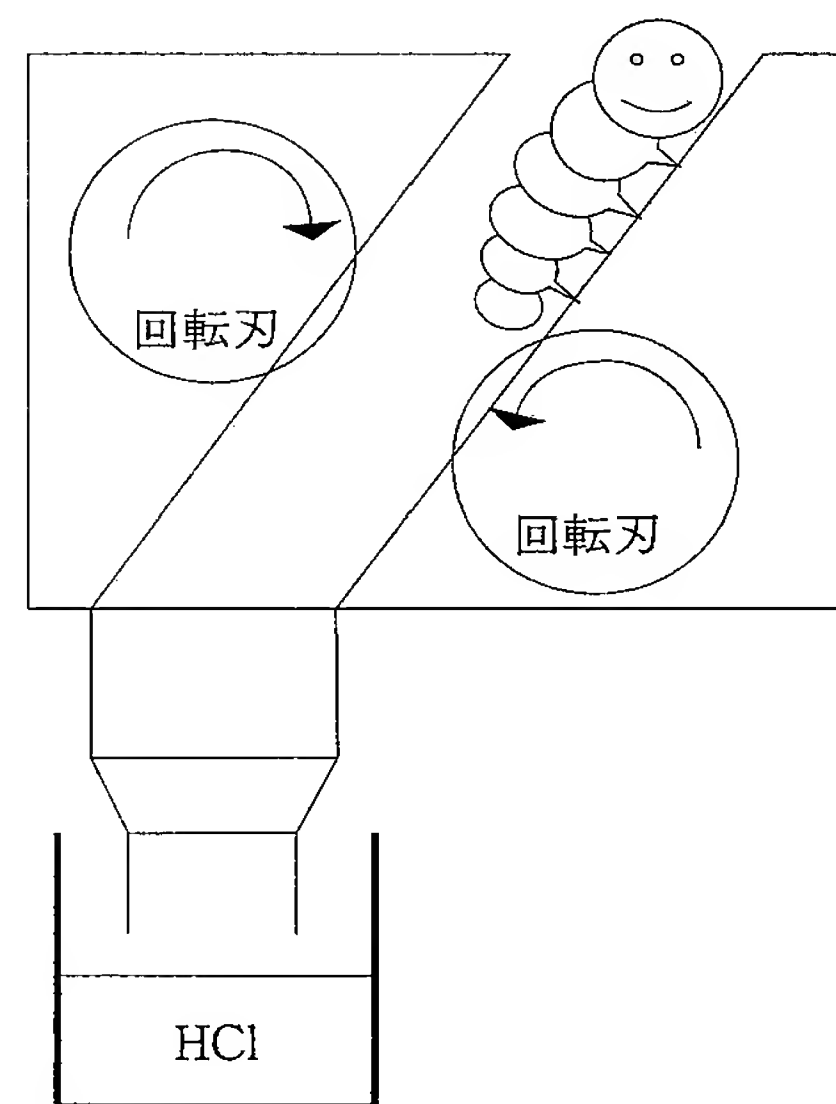


図3 回転刃使用のカイコ切開

表皮に傷が付いたカイコが塩酸の入った容器に入っているような設計となっている（伊藤, 1997）。例として、回転刃を使用する方法の概要を図3に示した。

4) 組換えウイルスの接種方法

組換えウイルスはポリヘドリン生産能がないためにウイルスが多角体に包埋されないのが不安定である。FeIFNをコードするcDNAを含む組換えウイルスを経口や経皮による感染を試みたが感染は認められなかった。

多数のカイコに多量の組換えウイルスを接種するのは機械化が困難なばかりでなく、多量の組換えウイルスを使用することになり、組換えウイルスの管理が煩雑になる。初期からの条件である5齢カイコ1頭あたり組換えウイルス50 μ lを注入する方法と、注射針を組換えウイルス液につけた後刺す方法とでrFeIFN ω の生産性を比較したところ、組換えウイルス接種後の飼育日数を調節することによって、カイコ1頭あたりのrFeIFN ω の生産の差をなくすことができた。このことを基にして、微量ポンプで一定量の組換えウイルス液をカイコに注入する方法を開発し実用化している。

4. おわりに

カイコ虫体を利用する系を初めとする昆虫バ

キュロウイルスの遺伝子発現系は、糖鎖を有するタンパク質の生産も可能であり、またその利便性から今後ますますポピュラーになっていくと思われる。

“インターキャット”の製造方法は、昆虫を用いた珍しいプロセスであり、また国内初のバイオ動物用医薬品であるため、この技術の実用化には旧農林水産省畜産局薬事室をはじめとする関係監督官庁、旧農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所をはじめとする研究所や大学、関係企業、動物病院など広範囲の方々にお世話をいただいた。名誉ある農林水産技術会議会長賞受賞にあたり、改めて衷心から感謝申し上げます。

参考文献

- Horiuchi, T. et al. (1987) Agric. Biol. Chem., 51: 1573-1580.
伊藤宰・米澤康男 (1997) 特開平9-19238, 9-70241.
Maeda, S. et al. (1985) Nature (Lond.), 315: 592-594.
Smith, G. E. et al. (1983) Mol. Cell Biol., 3: 2156-2165.
Ueda, Y. et al. (1993) J. Vet. Med. Sci., 55: 251-258.
Ueda, Y. et al. (1996) J. Seric. Sci. Jpn., 65: 472-476.
矢内顯・他 (1996) 日本特許第2513818号.
矢内顯・植田吉純 (1999) 日本特許第2621656号.

東レ株式会社 愛媛工場：〒791-3193 愛媛県伊予郡松前町大字筒井1515